



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Encapsulación de un par iónico como estrategia para incrementar la biodisponibilidad del atenolol.

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d' Alacant

Junio 2018

Autor: Marcos Planelles de Castro

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Marta González Álvarez y María Isabel González Álvarez

Resumen

El atenolol es un fármaco beta-bloqueante utilizado ampliamente en el tratamiento de la hipertensión arterial, arritmias, angina de pecho e infarto de miocardio. El estrecho control que requiere el tratamiento de estas enfermedades, justifica el uso de sistemas de liberación modificada como estrategia para alcanzar una farmacoterapia adecuada en el paciente. Sin embargo, la baja permeabilidad del atenolol a nivel intestinal limita la eficacia de estos sistemas para mejorar la biodisponibilidad por vía oral, por lo que se plantea la necesidad de explorar otras alternativas que permitan potenciar la permeabilidad del atenolol a nivel intestinal como puede ser la utilización de un par iónico.

El objetivo principal del estudio fue incrementar la biodisponibilidad por vía oral del atenolol mediante el desarrollo de nanopartículas (NPs) poliméricas de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), cargadas con un par iónico de atenolol - azul brillante. Tras la elaboración y caracterización de las NPs, se examinaron sus perfiles de liberación *in vitro*. También, se realizaron ensayos de biodisponibilidad *in vivo* en ratas Wistar para comparar los perfiles de concentración plasmática de atenolol-tiempo de la formulación de par iónico encapsulado en las NPs respecto a par iónico no encapsulado y atenolol libre.

Los resultados reflejaron que la liberación del par iónico desde las NPs era dependiente del pH, con una liberación máxima a pH 7.4. Además, el perfil de concentración plasmática-tiempo para las NPs mostró una liberación controlada a la vez que un incremento del tiempo de tránsito intestinal, permitiendo así obtener una biodisponibilidad para el atenolol cercana al 100%.

Se concluye, que la estrategia de combinar un sistema de liberación modificada (NPs) con una técnica para potenciar la permeabilidad del fármaco (par iónico), resulta de utilidad para obtener una pauta posológica y una biodisponibilidad óptimas por vía oral para fármacos de baja permeabilidad como el atenolol.

Introducción

Los fármacos se definen como moléculas o sustancias químicas de estructura conocida, que producen un determinado efecto biológico cuando se administran a un individuo. Dichas moléculas, son agrupadas junto con otros compuestos como excipientes, estabilizadores e incluso otros fármacos para dar lugar a unas preparadas químicas denominados medicamentos¹.

Desde un punto de vista ideal, el medicamento debería producir un efecto terapéutico útil en todos los sistemas biológicos del organismo, a los que va dirigido, sin inducir ningún efecto lateral no deseado². Pero la realidad no es así; de hecho todo medicamento tiene siempre efectos indeseados sobre el cuerpo humano, ya sea tanto por motivos de origen farmacodinámico como pueden ser las interacciones de agonismo, sinergismo, potenciación, o antagonismo; como por motivos de origen farmacocinético relacionados con los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolización o excreción (LADME), de ahí la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que nos permitan reducir e incluso evitar dichos inconvenientes.

Durante décadas, las enfermedades tanto agudas como crónicas se han tratado por medio la administración de fármacos formulados en formas farmacéuticas de liberación rápida, tales como cápsulas, soluciones, cremas, suspensiones, comprimidos, aerosoles, supositorios e inyectables. En la actualidad, los sistemas convencionales de liberación rápida, no solo son los más utilizados sino que además encabezan las ventas en el mercado farmacéutico. Sin embargo para cumplir con el objetivo de alcanzar y mantener unas concentraciones de fármaco dentro del margen terapéutico objetivo, se requiere de la administración de estos sistemas convencionales varias veces al día, lo que conlleva a una gran fluctuación de los niveles plasmáticos e incrementa el riesgo de incumplimiento del régimen de dosificación por parte del paciente, comprometiendo así la eficacia y seguridad del fármaco administrado³.

En los últimos años, los avances en las nuevas tecnologías han permitido desarrollar un gran número de nuevos sistemas de liberación de fármacos que presentan cierta mejoría respecto a los sistemas de liberación rápida. Un ejemplo de ello, serían los sistemas de liberación controlada o modificada (terminología adoptada por la Food and Drugs Administration (FDA) y por la European Medicines Agency (EMA) respectivamente).

Los sistemas de liberación modificada, se definen como aquellos sistemas de liberación de fármacos, en los que se modifica la velocidad de liberación del compuesto y/o el lugar donde se liberan; alcanzándose de esta forma objetivos terapéuticos que no podrían conseguirse con los sistemas convencionales de liberación rápida⁴. A la hora de desarrollar un sistema de liberación modificada, hay que considerar diversos parámetros como puede ser la vía de administración, el tipo de formulación o el fármaco que se va a administrar.

1. Vía de administración oral

La vía de administración supone uno de los aspectos más relevantes a la hora de desarrollar un sistema de liberación de fármacos. De entre las diferentes rutas, la vía oral es considerada como la ruta más fisiológica para la administración de fármacos. La absorción de nutrientes, fármacos y xenobióticos, se produce principalmente en el intestino delgado pero también puede ocurrir en otras localizaciones del tracto digestivo como puede ser el intestino grueso o el estómago⁵.

El intestino delgado es considerado como el lugar de absorción por excelencia, debido a que presenta una serie de condiciones y mecanismos óptimos para la absorción, tanto a nivel macroscópico (elevada superficie de absorción) como microscópico (organización celular y subcelular muy especializada)⁶. Pero hay que considerar otros factores fisiológicos que pueden influir en la absorción de los fármacos.

Estos factores, son los llamados efectos de pérdida presistémicas, que pueden producirse antes de la absorción (reacciones de descomposición del fármaco por efecto de las secreciones digestivas, de la flora bacteriana y de otros factores) y después de la absorción (efectos de primer paso intestinal y hepático). Otros aspectos a destacar, serían la motilidad intestinal y los cambios del pH a lo largo del tracto digestivo.

La motilidad intestinal, determina el tiempo de residencia de un fármaco en el intestino, por lo que supone un factor decisivo en la biodisponibilidad del mismo; ya que un tránsito demasiado rápido podría derivar en una absorción incompleta del fármaco, mientras que un tránsito prolongado en exceso podría aumentar la exposición del fármaco a factores como enzimas, flora bacteriana y secreciones en general, generando así efectos de pérdida presistémica ⁵.

Las variaciones de pH, que se producen a medida que avanzamos por el tracto digestivo pueden interferir en la absorción del fármaco; afectando principalmente a aquellos compuestos, que se asimilan por mecanismo de difusión pasiva a través de membrana lipídica. Existen diversos parámetros que condicionan la difusión pasiva de un compuesto como: la liposolubilidad, el tamaño o el grado de disociación/ ionización de la molécula.

El grado de ionización de un fármaco, hace referencia a la cantidad de compuesto que se encuentra en forma ionizada o con carga. Puede ser un factor limitante para la absorción por el mecanismo de difusión pasiva, ya que solo los compuestos neutros o sin carga son capaces de atravesar con facilidad las membranas biológicas por dicho mecanismo ⁷.

El grado de ionización de un compuesto, va a depender del pH del medio en el que se encuentre. Por lo tanto, un determinado fármaco a medida que avance por el tracto digestivo va a presentar diferentes grados de ionización, condicionando así la absorción del mismo en función de la región en la que se encuentre ⁷.

En el intestino delgado, el pH oscila entre 5-7,5; lo cual favorece la absorción de fármacos que presenten pKa intermedios (5-7,9), ya que en esas condiciones presenta un grado de ionización bajo. Por otro lado, otras regiones del tracto digestivo como el estómago (pH 1,2-2,5) o el intestino grueso (pH 7,5-8,5); son ideales para la absorción de fármacos con un pKa bajo (1- 4,9) y alto (8-11) respectivamente.

La función principal de todo sistema de liberación modificada, es dirigir la liberación del fármaco a aquellas regiones donde la absorción es óptima. En ese sentido, el colon reúne las propiedades idóneas para la absorción de fármacos, que en principio no son adecuados para ser absorbidos en el intestino delgado.

El colon, en comparación con el intestino delgado, presenta una superficie de absorción mucho más baja y menos especializada. Sin embargo, el colon pese a su baja especificidad, en ocasiones supera al intestino delgado en lo que se refiere a capacidad de absorción; como ocurre en el caso de compuestos básicos con un pKa elevado. Dichos compuestos, se encuentran casi totalmente disociados o ionizados a pH intestinal mientras que a pH cólico, presentan un elevado porcentaje de forma no ionizada o neutra; lo cual favorece la absorción del compuesto por difusión pasiva a través de la membrana lipídica ⁶.

Por otro lado, el tiempo de residencia en colon es mucho más prolongado que en el intestino delgado. En la práctica, el tiempo útil para la absorción de compuestos en colon oscila entre 8-12 horas; lo cual es más que suficiente para fármacos de absorbabilidad moderada o escasa completan allí la absorción ^{5, 8}.

2. Opciones de formulación

El atenolol es un fármaco bloqueante de los receptores beta-adrenérgicos, que ejerce una acción selectiva sobre los receptores beta-1 del corazón. El bloqueo de dichos receptores, impide que estos sean estimulados por la acción de neurotransmisores como la noradrenalina, disminuyendo así la respuesta simpática en el corazón, la cual se traduce en una reducción de la frecuencia cardíaca, de la presión arterial y de la contractibilidad del corazón.

Dada a su actividad cardioselectiva, el atenolol es utilizado principalmente en el tratamiento de la hipertensión arterial, arritmias, angina de pecho e infarto cardiaco. El tratamiento de dichas enfermedades, requiere un adecuado control tanto de la posología como de las fluctuaciones plasmáticas, además de una correcta adherencia y cumplimiento por parte del paciente. Estos motivos, justifican el empleo de sistemas de liberación modificada, ya que facilitaría la farmacoterapia del paciente (reducción de dosis y posología, mejora de la adherencia...etc.) y evitaría complicaciones derivadas de un mal control de la enfermedad.²²

2.1 Nanopartículas

En lo que se refiere al desarrollo de sistemas de liberación modificada, la selección de un vehículo que sea a la vez, compatible tanto con el fármaco que se va a transportar como con el organismo; es esencial para asegurar unos niveles óptimos de seguridad y eficacia. El vehículo para el transporte del fármaco, se define como un soporte, en cual es incorporado el principio activo y que posteriormente permitirá la liberación del mismo^{9,10}.

A lo largo de los años, se han desarrollado diversos tipos de vehículos para el transporte de fármacos, destacando: las micelas, los dendrímeros, los liposomas o las micro/nanopartículas, entre otras.¹¹

Las nanopartículas son cuerpos con una dimensión del orden $<1 \mu\text{m}$ y han demostrado ser un vehículo muy útil en el desarrollo de formulaciones de liberación controlada de fármacos, debido a su capacidad para proporcionar una amplia variedad de fármacos a diferentes tejidos y órganos diana durante un período prolongado de tiempo¹². La liberación del principio activo al medio por estos vehículos, está condicionada principalmente por las propiedades de los materiales empleados aunque también depende en menor medida de otros factores, como pueden ser el pH o los fluidos y enzimas del organismo¹³.

Existen una gran cantidad de materiales con diferentes propiedades, que pueden ser empleados en la elaboración de nanopartículas; entre ellos, destacan los materiales de tipo: metálico, carbonoso, cerámico o polimérico; siendo los materiales poliméricos los más estudiados y utilizados en los sistemas de liberación modificada^{14,15}.

Durante los últimos años se ha optado por el empleo de polímeros biodegradables. Los materiales biodegradables, son degradados por las rutas metabólicas naturales del organismo dando lugar a materiales no tóxicos que luego son asimilados o eliminados por el cuerpo. Se distinguen 2 tipos: los de origen natural y los de origen sintético.

Los polímeros de origen natural se caracterizan por ser más biocompatibles con el organismo y por obtenerse más fácilmente y a un menor coste, en comparación con los polímeros sintéticos. Sin embargo, presentan el inconveniente de presentar diferentes purzas y características en función de la fuente de procedencia (microbiana, vegetal o animal).

Por otro lado, los polímeros sintéticos, presentan la ventaja de poder controlar su síntesis y con esta, sus propiedades y pesos moleculares, lo cual hace que sean más empleados en nuevos desarrollos, en comparación con los polímeros de origen natural. De entre los polímeros sintéticos más empleados

encontramos la policaprolactona, el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) o combinaciones de los mismos como por ejemplo el PLGA ¹⁴.

El PLGA es un compuesto aprobado tanto por la FDA como por la EMA y se caracteriza por tener un buen grado de compatibilidad con el organismo, presentando unos perfiles de toxicidad muy bajos³⁰. La buena compatibilidad del PLGA, se debe, principalmente, a que es degradado fisiológicamente por medio de sus enlaces éster, dando lugar a sus respectivos monómeros (PGA Y PLA); que a su vez, son incorporados en el metabolismo a través de procesos fisiológicos a nivel celular. Otra ventaja que presenta el PLGA, es la de regular la velocidad de su descomposición en función de la proporción de PLA: PGA que presente.

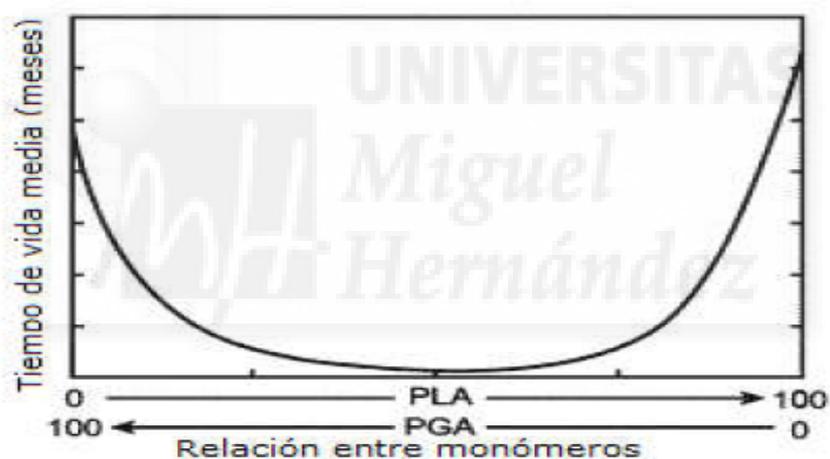


Figura 1: Tiempo de vida media para del PLGA, en función de su proporción de PLA: PGA

Las nanopartículas poliméricas han resultado ser eficaces al emplearse como sistemas de liberación modificada en terapias antitumorales, sistemas linfáticos, aplicaciones tópicas y vacunas. También han demostrado buenos resultados en la administración por vía oral de péptidos y fármacos proteicos, que en principio no son compatibles para ser administrados por esta vía ya que estos, son degradados completamente en el estómago e intestino delgado ¹⁶⁻²¹.

Por lo tanto no es de extrañar, que actualmente se intente trasladar la utilización de estos sistemas en fármacos de naturaleza no proteica, que tampoco son compatibles para ser administrados por vía oral.

El atenolol, presenta una biodisponibilidad oral en humanos del 40-50%, con una fracción absorbida del 57%³²; por lo que es considerado como un fármaco de baja permeabilidad tanto a nivel del intestino delgado como del colon; siendo así, poco compatible para ser administrado por vía oral^{27, 31}.

Sin embargo la baja permeabilidad del atenolol, limita la eficacia de sistemas de liberación modifica (NPs) a la hora de mejorar la biodisponibilidad. Dichos sistemas, solo regulan el lugar y/o la velocidad liberación del fármaco sin alterar la permeabilidad del mismo a través de las membranas biológicas, consiguiéndose únicamente una absorción poco consistente del compuesto.

Por lo tanto, es necesario explorar otras alternativas que permitan mejorar la biodisponibilidad por vía oral para fármacos de baja permeabilidad como el atenolol.

2.2 Par iónico

Existen diferentes estrategias orientadas a potenciar y mejorar la permeabilidad de este tipo de compuestos. De entre las técnicas más empleadas destacan el uso de surfactantes u otros excipientes como potenciadores de la permeabilidad o formular nuevas entidades moleculares (profármacos) que presenten características diferentes en comparación con la molécula original. Otra estrategia a destacar sería la formación de pares iónicos.^{23, 24}

Un par de iónico, es una pareja de iones de carga opuesta unidos por la atracción de Coulomb (unión débil) y sin la formación de un enlace covalente. De esta forma se consigue neutralizar de forma reversible y temporal los diferentes grupos ionizables (regiones con carga) de un compuesto mejorando

así su permeabilidad a través de las membranas biológicas. Una vez absorbido en sangre, el par iónico se desplaza o disocia.

La estrategia del emparejamiento iónico presenta varias ventajas: mejora la estabilidad y la permeabilidad a través de membranas biológicas, no implica una alteración en la estructura y función del fármaco; y elimina la necesidad de depender de transportadores y mecanismos enzimáticos de activación específicos para su absorción.^{25, 26}

En la literatura, encontramos numerosos estudios sobre la utilización de pares iónicos como estrategia para mejorar con éxito la permeabilidad de fármacos a través de las diferentes vías de administración (transdérmica, parenteral, inhalatoria y oral). En los que se refiere a la vía oral, los fármacos con alta polaridad, ionizados a pH intestinal y con un grado de permeabilidad bajo, serían los candidatos perfectos para el empleo de dicha técnica. El atenolol cumple todas estas condiciones.²⁵⁻²⁷

Por otro lado, el atenolol se caracteriza por ser un fármaco básico ($pK_a = 9.6$), que presenta un grupo amino secundario ionizado con carga positiva a pH fisiológico. En estudios previos (Isabel Lozoya et al³²), se ha estudiado la compatibilidad del atenolol con diferentes contra-iones con los que poder formar pares iónicos, además de su rendimiento para potenciar la permeabilidad del mismo por vía oral.

De entre las diferentes moléculas estudiadas destacan tintes o colorantes aniónicos como el azul de bromofenol o el azul brillante, demostrando ser ideales para combinarse junto al atenolol; ya que además de mejorar la permeabilidad del atenolol a nivel intestinal, presentan un perfil de toxicidad bajo para el organismo.³²

Sin embargo, el emparejamiento iónico presenta el inconveniente de interactuar con otras moléculas con carga que se encuentran en el entorno. A lo largo del tracto digestivo, el par iónico administrado, se va a encontrar con numerosos compuestos (enzimas, agentes quelantes...etc.) ionizados con las que poder reaccionar; produciendo así la ruptura del par iónico y limitando la eficacia de la técnica para aumentar la permeabilidad del fármaco.

Por lo tanto, podría resultar beneficioso desarrollar una nueva estrategia que combine la formulación de un par iónico con un sistema de liberación modificada; como pueden ser las nanopartículas. Al aislar el par iónico en el interior de las nanopartículas, se evita su interacción con el entorno hasta el momento de su liberación en el lugar óptimo de absorción; y al mismo tiempo el par iónico, potencia la permeabilidad del fármaco, solucionando así la limitación de los sistemas de liberación controlada con los compuestos de baja permeabilidad.

En este estudio, se ha aplicado dicho enfoque con tal de mejorar la biodisponibilidad del atenolol por vía oral. Para ello, se elaboraron unas nanopartículas poliméricas de PLGA que englobaban un par iónico, formado por atenolol y azul brillante, en su interior (Fig.2.).

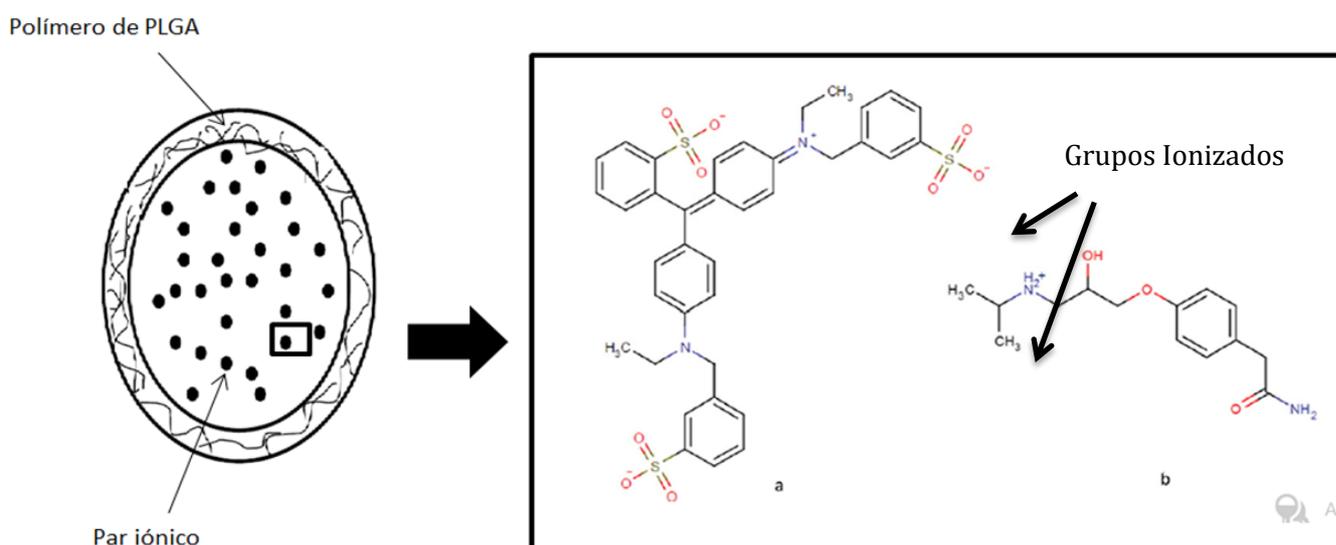


Figura 2: Esquema de nanopartícula polimérica de PLGA (izquierda) englobando un par iónico (derecha) de atenolol (molécula b) + azul brillante (molécula a).

Objetivos

El objetivo principal del estudio fue incrementar la biodisponibilidad del atenolol por vía oral, mediante el desarrollo de nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con un par iónico de atenolol - azul brillante.

Los objetivos específicos han sido:

- 1) Obtención y caracterización de nanopartículas de PLGA cargadas con el par iónico atenolol-azul brillante.
- 2) Realización de estudios de liberación *in vitro* de las nanopartículas desarrolladas.
- 3) Realización de estudios de biodisponibilidad *in vivo* del atenolol formulado como par iónico encapsulado en nanopartículas respecto al par iónico sin encapsular y atenolol libre.

Sección Experimental

1. Materiales

El atenolol, el azul brillante, el poli (alcohol vinílico) (PVA), el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50 se adquirieron en Sigma-Aldrich. El agua, el acetonitrilo y el metanol utilizados eran de grado HPLC. Todos los demás productos químicos empleados eran de grado analítico reactivo.

2. Preparación de las nanopartículas

Las nanopartículas cargadas con el par iónico de atenolol y azul brillante, se prepararon realizando una modificación del método de nanoprecipitación descrito por Bonelli et al.²⁸. Se disolvieron 1,33 mg de atenolol y 3,96 mg de azul brillante en una solución de 50 ml de PVA al 1% (p / v). Por otro lado, se adicionaron 95 mg del polímero PLGA 50:50 en 5 ml de acetona. Una vez disuelto el PLGA en la acetona, se añadió gota a gota con la ayuda de una jeringa en la solución de PVA con atenolol y azul brillante bajo agitación magnética.

La agitación magnética se mantuvo durante 3 h a 300 rpm para conseguir la evaporación de la acetona. La suspensión resultante se sometió a centrifugación a gran velocidad (7500 g, 20 min) para recuperar las nanopartículas. Finalmente se retiró el sobrenadante resultante y se dejó secar las nanopartículas a temperatura ambiente durante 24 horas.

3. Caracterización de las Nanopartículas

Las nanopartículas desarrolladas, se diluyeron en un tampón salino isotónico (pH 7) y se determinó el índice de polidispersidad (PDI), el potencial zeta (ZP) y el tamaño de las nanopartículas (diámetro), con un Zetasizer nano ZS de Malvern Instruments Ltd. Los datos obtenidos se procesaron con el software Malvern Zetasizer versión 7.11.

Por otro lado, la eficacia de encapsulación (EE%) y el grado de carga (LD%), fueron los parámetros utilizados para determinar la capacidad de la nanopartículas para encapsular al par iónico. Dichos parámetros, se calcularon por diferencia entre la concentración (C) o cantidad (Q) total de fármaco utilizado para preparar las nanopartículas y la concentración o cantidad de fármaco restante en el sobrenadante después de la centrifugación, tal y como se muestran en los esquemas (1) y (2). Tanto el atenolol como el azul brillante del sobrenadante, se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

$$EE\% = \frac{(C_{total} - C_{libre})}{C_{total}} \times 100 \quad (1)$$

$$LD\% = \frac{(Q_{fco\ total} - Q_{fco\ libre})}{Q_{total\ NP}} \times 100 \quad (2)$$

También se observó, la morfología y superficie de las nanopartículas por medio de un microscopio electrónico de barrido modelo S4800 (HITACHI) con cañón de emisión de campo (FEG) y con una resolución de 1.4nm a 1kV.

Previamente, antes de observar las muestras en el microscopio, se les realizó un recubrimiento metálico de oro/paladio durante 2 minutos, con el que se

recubrió toda la muestra formando una capa de unos 10 nm, con el objetivo de hacerla más conductora a la electricidad.

4. Estudios de liberación *in vitro* del par iónico (atenolol-azul brillante) a partir de nanopartículas

Para estimar la liberación del par iónico desde las nanopartículas, se adicionaron 5 mg de las mismas, en diferentes vasos con 10 ml de solución tampón estándar con distintos valores de pH. Por otro lado, como fisiológicamente el valor del pH cambia a lo largo del tracto gastrointestinal²⁹, también se realizó un ensayo de liberación que simula dichas condiciones.

El esquema seguido fue: vaso 1 (pH 1.2), vaso 2 (pH 4.5), vaso 3 (pH 6.8), vaso 4 (pH 7.4) y vaso 5 (simulación gastrointestinal).

El ensayo, se realizó bajo agitación magnética (100 rpm) a 37 °C, con una medición continua de los valores de pH con un pH-metro. El cambio de pH de la simulación gastrointestinal se realizó en el mismo recipiente, según el tiempo y la composición indicada en la Tabla 1.

Tabla 1: Esquema del ensayo de liberación según las condiciones del tracto gastrointestinal

Tiempo (h)	pH	Composición	Región Simulada	Tiempo de toma de muestra (h)
1.5	1.2	A) Solución estándar tampón fosfato pH 1.2	Estómago	0.083, 0.25, 0.5, 1, 1.5
0.25	4.5	B) A + NaOH 1M c.s.p pH 4.5	Duodeno	1.58, 1.75
2.75	6.8	C) B + NaOH 1M c.s.p pH 6.8	Jejuno e Íleon	2, 3, 4, 4.5
Resto de ensayo	7.4	D) C + NaOH 1M c.s.p pH 7.4	Colon	4.58, 5, 6, 8, 22, 24, 44, 48, 72

Se tomaron muestras durante un periodo de 72 h. Las muestras tomadas, se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, las concentraciones de atenolol y azul brillante, presentes en el sobrenadante, se determinaron por HPLC.

5. Estudios de biodisponibilidad *in vivo* de atenolol

El Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández aprobó los protocolos experimentales *in vivo* (España, código UMH-DI-MBS-02-15)

La permeabilidad del atenolol para los grupos estudiados: suspensión de nanopartículas, solución de par iónico (atenolol y azul brillante en solución) y solución de atenolol, se determinaron *in vivo* usando ratas Wistar.

Mi participación en este estudio *in vivo*, se limitó a la preparación de los materiales y soluciones de trabajo necesarias y al procesado y posterior análisis de las muestras extraídas. Todo procedimiento quirúrgico así como la administración de fármacos y la toma de muestras del animal, fue realizado por personal cualificado, en posesión del título de experimentación animal. El procedimiento del ensayo *in vivo* se detalla a continuación:

5.1 Soluciones de trabajo: Suero fisiológico heparinizado

Se elaboró, a partir de 500 ml de una solución de NaCl al 0.9% (suero fisiológico) a la que se le añadió 1ml heparina sódica al 5%, obteniendo así, una mezcla con una concentración de 10 U.I. /mL de heparina. Esta preparación, se empleó para el lavado y mantenimiento del catéter y para restablecer en el animal el volumen extraído con cada muestra plasmática.

5.2 Técnica experimental.

La técnica quirúrgica empleada se basa en la implantación permanente, de un catéter o cánula, en la vena yugular del animal durante todo el experimento.

De esta forma, se pueden conseguir muestras plasmáticas de forma rápida y sencilla, a los tiempos establecidos, sin que el animal sufra y sin tener que utilizar la anestesia constantemente en cada toma de muestra.

El catéter se preparó a partir de un tubo de silicona de grado médico. Partimos de un trozo de tubo de unos 15-20 cm de longitud, al cual se le cortó uno de los extremos en forma de bisel, para facilitar su posterior implantación en la vena yugular de la rata.

A pocos centímetros de dicho extremo (3-4 cm) se fijó con un sellador de silicona, un hilo de unos 8-10 cm aproximadamente, esto sirve para sujetar el catéter. Una vez elaborado el catéter, se dejó secar a temperatura ambiente para endurecer la silicona.

Una vez secos, se procede a anestésiar al animal por medio de una inyección en la región intraperitoneal (se utilizó una mezcla de pentobarbital (40 mg/kg) y butorfanol (0.5 mg/kg)). Cuando el animal alcanza el estado de anestesia profunda (ausencia de respuesta del reflejo palpebral), se coloca sobre una tabla en posición de decúbito supino y se inmovilizan las extremidades con cinta adhesiva.

5.2.1 Canulación de la vena yugular

En la región comprendida entre las extremidades superiores y en cuello del animal, se localiza la zona en la que se detecta el pulso y se impregna con povidona yodada.

Con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras de punta roma, se realiza un corte en la piel del animal (1 cm aproximadamente) y se separan las capas de tejido dejando al descubierto la vena yugular. Utilizando las pinzas, se realiza la limpieza de las zonas que rodean la vena, eliminando así restos de grasa y tejido, que pueden interferir en la implantación del catéter.

Posteriormente, se procede a la exteriorización de la cánula, realizando un desbridamiento de la sección de un tramo subcutáneo hasta la región cervical; quedando de esta forma la parte externa de la cánula en posición dorsal.

Finalizada la operación, se comprueba que la cánula funciona correctamente por medio de la extracción de un pequeño volumen de sangre con una jeringuilla. Si funciona correctamente, se procede a eliminar el catéter sobrante, dejando al exterior una sección de unos 4-5 cm de longitud, la cual es más que suficiente para tomar las muestras de sangre por medio de un tubo de silicona conectado al catéter por medio de un puente metálico.

5.2.2 Administración del fármaco y toma de muestra

Tras la canulación de la vena yugular, se deposita al animal en una jaula con comida y agua y se deja en recuperación, durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, ya se puede administrar el fármaco del ensayo.

5.2.2.1 Administración por vía oral

La administración oral de las preparaciones, se realizaron por medio de una sonda gastroesofágica.

Se administraron 3 tipos de preparaciones (Tabla 2): suspensión de nanopartículas, solución de par iónico (atenolol + azul brillante) y solución de atenolol; empleando como vehículo una solución salina a pH 6,8.

Tabla 2: Esquema de las dosis empleadas en las preparaciones administradas

Preparación	Concentración atenolol	Dosis por rata	Volumen por rata
Suspensión de NPs	0,5 mM	32,6 mg de NPs **	2 ml
Solución de Par iónico	0,5 mM	0,266 mg de atenolol + 0,789 mg de azul brillante	2 ml
Solución de atenolol	0,5 mM	0,266 mg de atenolol	2 ml

** La cantidad de NPs a administrar se determinó en función de la EE% para el atenolol**

Los animales empleados en el estudio, fueron asignados aleatoriamente (n= 5, por grupo) a los siguientes grupos: Grupo 1: solución de atenolol; Grupo 2: solución de Par iónico; Grupo 3: suspensión de NPs.

5.2.2.2 Obtención y tratamiento de las muestras sanguíneas.

Se extrajeron muestras de sangre (0,5 ml aproximadamente) con jeringas heparinizadas (previamente se pusieron en contacto con heparina) y se reemplazaron por solución salina heparinizada (10 UI / ml), en un tiempo de muestreo previamente establecido durante 30 h.

Las muestras sanguíneas extraídas, se sometieron a centrifugación a 20000 r.p.m. durante 10 minutos, produciéndose la separación del plasma. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 μ L (el resto de plasma obtenido se congeló a -20°C), a las que se adicionaron 100 μ L de metanol con el objetivo de producir la desnaturalización de las proteínas. Dicho procedimiento es necesario ya que las proteínas pueden obstruir la columna del HPLC impidiendo así que funcione correctamente.

Tras la adición de metanol, cada muestra se sometió a una nueva centrifugación durante 10 minutos a 20000 r.p.m. para separar las proteínas desnaturalizadas. Se extrajeron 100 μ L del sobrenadante resultante, y se adicionaron en viales para ser valorados posteriormente por HPLC.

Los parámetros obtenidos por medio de la valoración por HPLC: el área bajo la curva (AUC_{0-∞}), la concentración plasmática máxima del fármaco (C_{max}) y el tiempo para alcanzar C_{max} (T_{max}), se emplearon para evaluar las diferencias existentes entre las 3 formulaciones estudiadas: suspensión de NPs, solución de par iónico y solución de atenolol.

6. Análisis de HPLC

En el análisis de las concentraciones de atenolol y azul brillante, se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección por UV.

Como sistema cromatográfico, se empleó el Sistema Alliance® HPLC, el cual consta de las siguientes secciones:

- Detector programable de UV Waters™ 2475.
- Módulo de Separaciones Waters™ 2695 con un inyector automático integrado y una bomba cuaternaria.
- Registrador/Integrador Empower™.

La fase móvil empleada, fue una mezcla con una proporción volumétrica 5:90:5 de metanol, solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.05% y acetonitrilo respectivamente; para el atenolol y una proporción en volumen 50:50 de solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.05% y acetonitrilo para el azul brillante.

La fase estacionaria utilizada, está constituida por:

- Columna de acero inoxidable Waters™ modelo Nova Pak® C18 con 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y 4 μm de tamaño de partícula.
- Precolumna Phenomenex® KJ0-4282 con un relleno de micropartículas C18 de un tamaño de 40 μm (Phenomenex AJO-4287, C18 4 x 3.0 mm) y un par de filtros de 2 μm

Se empleó un método isocrático con una velocidad de flujo de 1 ml/min, con unos 30°C de temperatura de columna.

Por otro lado, la detección en UV se realizó con una longitud de onda de 231 nm para el atenolol y de 623 nm para el azul brillante. En estas condiciones el tiempo de retención del compuesto analizado fue de 5 minutos y 6 minutos para atenolol y azul brillante respectivamente.

Por último, para determinar la concentración de atenolol y azul brillante, en las muestras analizadas, se elaboraron unas curvas de calibración; estableciendo previamente los límites de detección y cuantificación, la linealidad del modelo y la exactitud del procedimiento analítico.

7. Análisis de datos

Los valores de permeabilidad del atenolol obtenidos, se valoraron mediante la prueba estadística ANOVA para determinar la presencia de diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%. Para el análisis *post hoc* posterior se aplicó la estadística de Levene para determinar la homogeneidad de las varianzas.

Resultados y Discusión

El objetivo principal del estudio fue incrementar la biodisponibilidad por vía oral del atenolol mediante el desarrollo de nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con un par iónico de atenolol - azul brillante.

1. Obtención y caracterización de NPs

Las nanopartículas se desarrollaron según el método descrito en la sección experimental. A nivel macroscópico se obtuvo un sólido blanco ligeramente azulado.

En la Tabla 3 y Fig.3., se muestran la caracterización y las imágenes de las NPs desarrolladas obtenidas por microscopio electrónico, respectivamente. En lo referente a la caracterización, se presentan los resultados sobre el tamaño (diámetro), potencial zeta (ZP), índice de polidispersidad (PDI), eficacia de encapsulación (EE%) y grado de carga (LD%).

Tabla 3: Caracterización de las nanopartículas en términos de diámetro, ZP, PDI, EE% y LD%; (n = 3, media \pm desviación estándar).

Diámetro (nm)	PDI	ZP (mV)	EE% Atenolol	LD % Atenolol	EE% Azul brillante	LD % Azul brillante
437.3 \pm 8.9	0.24 \pm 0.08	-7.4 \pm 0.4	61.3 \pm 3.4	4.6 \pm 0.1	43.3 \pm 0.2	4.4 \pm 0.1

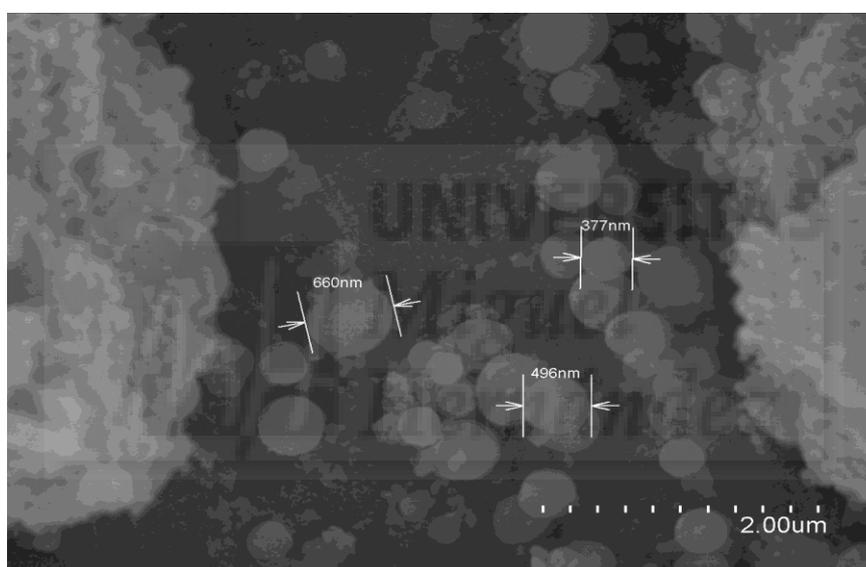
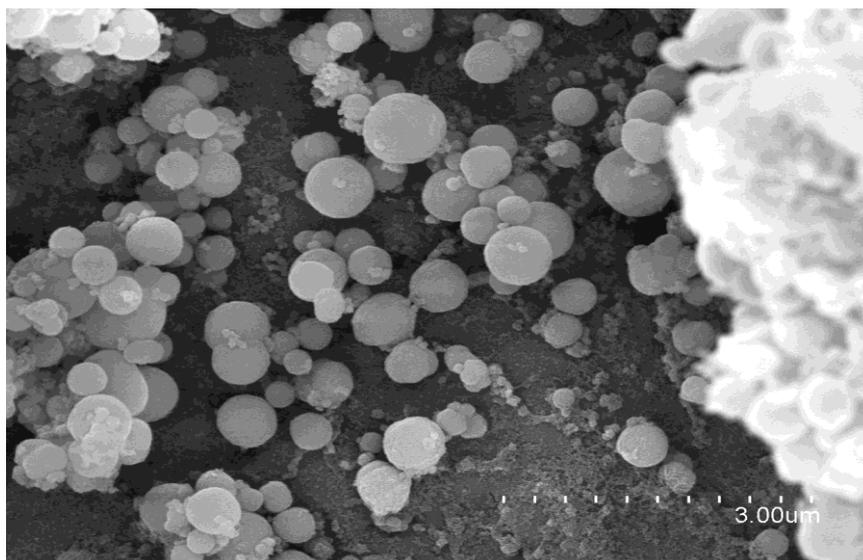


Fig.3. Imágenes de las NPs desarrolladas, obtenidas por microscopio electrónico.

Aunque existe cierta dispersión de tamaños en las NPs, tal como se observa en la Fig.3.; en general, el tamaño medio es $<1 \mu\text{m}$ de diámetro (Tabla 3). Por lo tanto las NPs desarrolladas, se encuentran dentro del rango de tamaño adecuado.

Por otro lado, las NPs elaboradas, presentan una superficie uniforme sin irregularidades (Fig. 3.) y presentan una EE% aceptable tanto para el atenolol (61%) como para el azul brillante (43%), tal y como se refleja en la Tabla 3.

2. Ensayos de liberación *in vitro*

Los perfiles de liberación del ensayo *in vitro* de las nanopartículas desarrolladas, se muestran en la Fig. 4. y Fig.5. Las gráficas muestran la liberación de ambos compuestos en diferentes condiciones: pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.4 (Fig.4.) y simulación gastrointestinal (Fig.5.).

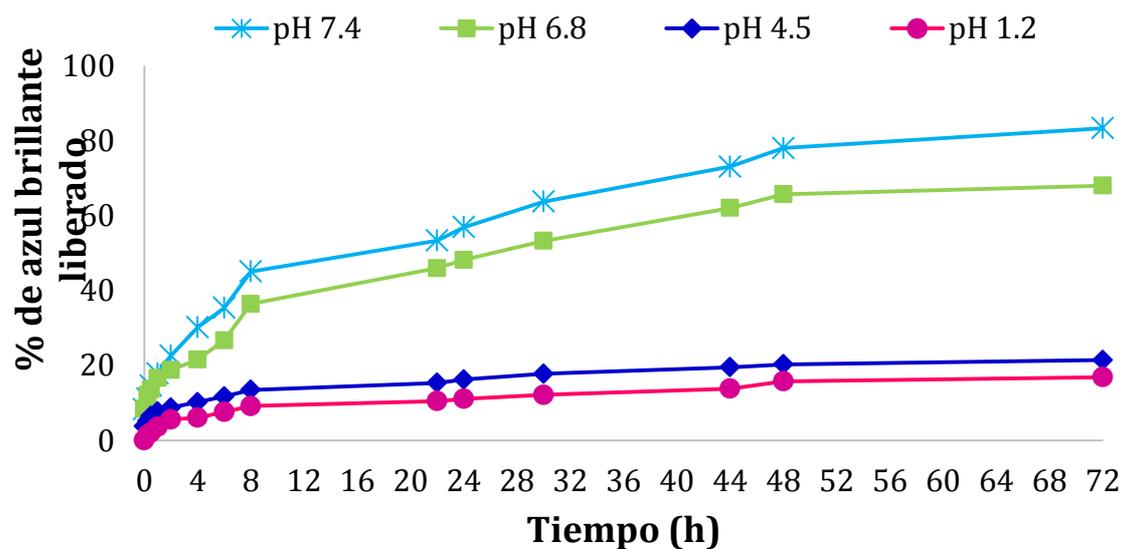
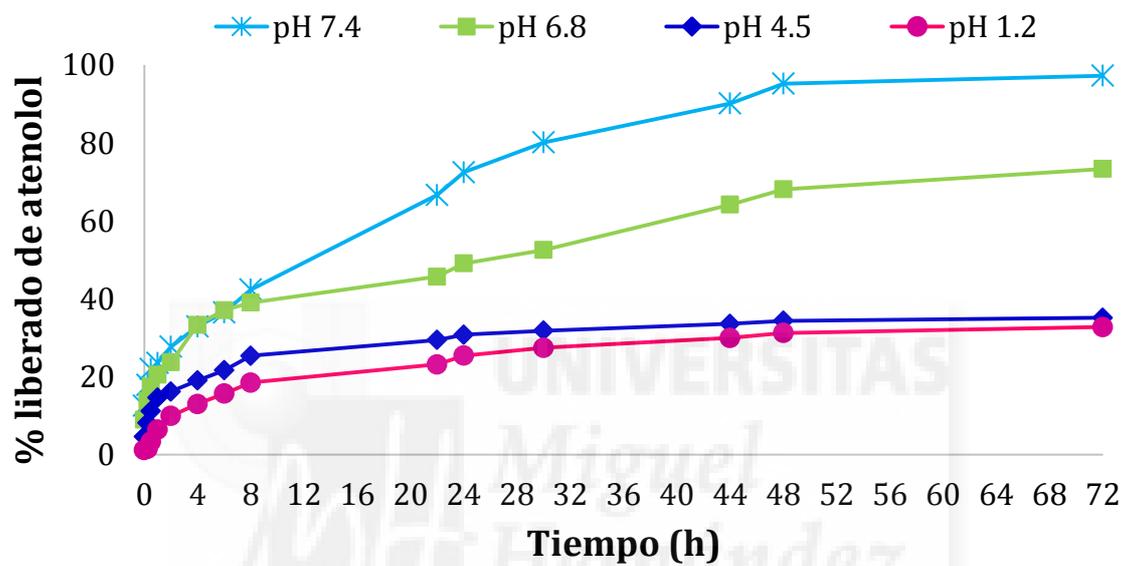


Fig. 4. Perfiles de liberación, que reflejan el porcentaje de atenolol y azul brillante liberado desde las NPs frente al tiempo, en las diferentes condiciones planteadas: pH 1.2, 4.5, 6.8, 7.4; (n = 3).

En las gráficas (Fig. 4.) se observa que la liberación tanto de atenolol como de azul brillante, en medio ácido (pH 1.2 y pH 4.5) apenas supera el 20%-30%; mientras que la cantidad liberada a pH más elevados (pH 6.8 y 7.4), fue muy superior (60-95% aproximadamente) en comparación con el medio ácido.

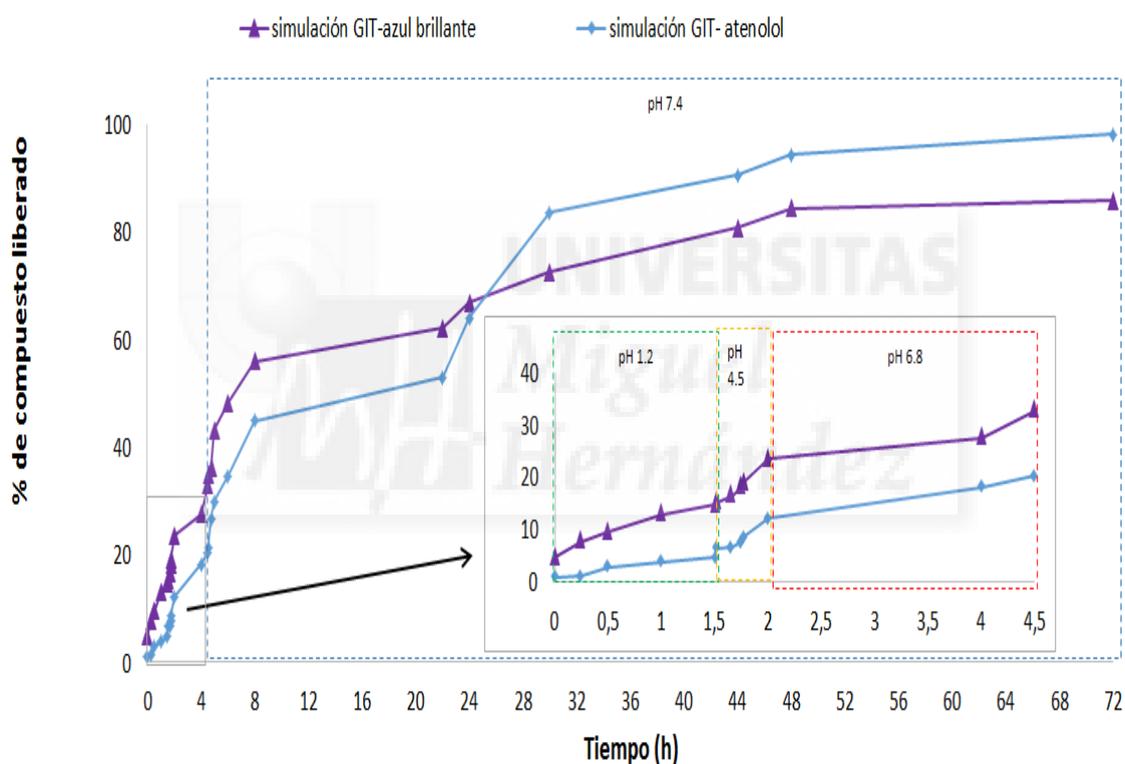


Fig.5. Perfiles de liberación de la simulación gastrointestinal, que reflejan el porcentaje de atenolol y azul brillante liberado desde las NPs frente al tiempo, en los diferentes rangos de pH; (n = 3). GIT: tracto gastrointestinal.

Los perfiles de liberación de la simulación gastrointestinal (Fig.5.) muestran un incremento progresivo de la liberación tanto de atenolol como de azul brillante, a medida que aumenta el valor de pH; presentando una liberación máxima a pH 7.4.

Por lo tanto, no solo se puede afirmar que las nanopartículas elaboradas en este estudio presentan un perfil de liberación dependiente del pH sino que además, la mayor parte de la liberación del par iónico ocurrió en condiciones fisiológicas propias del colon (pH 7.4).

Dichos resultados se consideran positivos, ya que los fármacos básicos como el atenolol, se absorben con mayor facilidad en entornos con un pH elevado como puede ser el íleon o el colon.

Por otra parte, el porcentaje máximo de liberación en los ensayo in vitro fue del 95 % y del 80 % para atenolol y azul brillante respectivamente. Estos resultados sugieren que después de 72 h, se ha liberado prácticamente toda la cantidad de par iónico.

Sin embargo, esto podría suponer un problema ya que el tiempo total de tránsito gastrointestinal en humanos es de alrededor de 20-30 h⁵; una vez superado dicho intervalo de tiempo, las nanopartículas se habrán eliminado del organismo; reduciéndose así el % total de fármaco liberado, lo cual puede dar lugar a una situación de infradosificación en el paciente.

Una posible solución para evitar la infradosificación, podría ser tener en cuenta el % de fármaco liberado a esos tiempos (20-30 h) para estimar la cantidad necesaria de nanopartículas que se ha de administrar para alcanzar las concentraciones plasmáticas requeridas del fármaco. Por otro lado, este problema también puede se puede abordar por medio de otras estrategias como la bioadhesión.

Las estrategias de bioadhesión permiten que una determinada forma farmacéutica permanezca en contacto con la superficie u órgano objetivo durante un período prolongado de tiempo. Este tipo de técnicas se pueden aplicar a los sistemas de liberación de fármacos dirigidos al colon, debido a que este presenta una serie de características específicas ideales para lograr la bioadhesión.^{33, 34}

3. Ensayos de biodisponibilidad *in vivo*

Los ensayos *in vivo* mostraron diferencias importantes entre los grupos estudiados: atenolol en solución, par iónico (atenolol + azul brillante) en solución y las NPs en suspensión. Dichas diferencias pueden apreciarse a primera vista en los perfiles de concentración-tiempo reflejados en la Fig.6.

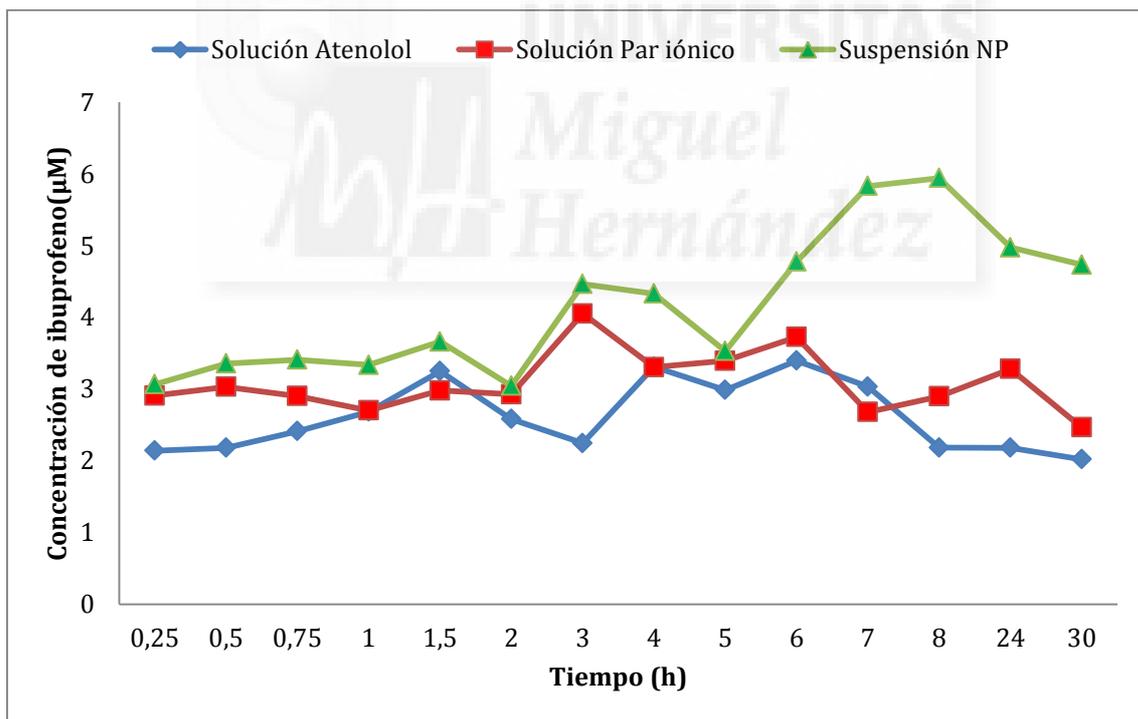


Fig.6. Concentración de atenolol en plasma frente al tiempo, obtenido en ratas tras la administración oral de los diferentes grupos analizados: Solución de atenolol, solución de par iónico y suspensión de NPs (n = 5, por grupo).

La gráfica (Fig.6.) muestra las concentraciones plasmáticas de atenolol para los diferentes grupos estudiados. En ella se observa, que los niveles de atenolol en sangre para el grupo de las NPs son siempre más elevados, en comparación con los otros 2 grupos. Dichos resultados, son indicativos del buen funcionamiento de la formulación desarrollada en este trabajo para mejorar la biodisponibilidad del atenolol por vía oral.

Por otro lado, en la Tabla 4 se muestra el AUC de los perfiles de plasma obtenidos con los diferentes grupos estudiados además de otros parámetros como la Cmax, Tmax e incremento de biodisponibilidad (ΔF).

Tabla 4: Valores de AUC, Cmax, Tmax y ΔF de los grupos analizadas: solución de atenolol, solución de par iónico y suspensión de NPs; (n = 5, media \pm desviación estándar).

	AUC t0-∞ (ml⁻¹ h⁻¹)	Cmax(μM)	Tmax (h)	ΔF
Solución de Atenolol	69,857 \pm 0,008	3,396 \pm 0,469	6 \pm 0,825	-
Solución de Par iónico	92,221 \pm 0,074	4,053 \pm 0,491	4 \pm 1,737	1,320 \pm 0,179
Suspensión de NPs	150,226 \pm 1,751	5,944 \pm 2,208	8 \pm 0,707	2,150 \pm 0,334

Nota: ΔF se calcula como AUC de X / AUC solución atenolol; siendo X= suspensión NPs o solución Par iónico.

Al comparar los resultados del grupo de la solución de atenolol con los del grupo de la solución del par iónico, se observa que este último presenta una Cmax superior y un Tmax más corto. Estos resultados son los que se esperaba de utilizar fármacos formulados como par iónico, ya que al neutralizar las cargas del compuesto se consigue que este sea más permeable a las membranas biológicas del tracto gastrointestinal; aumentando así la velocidad de absorción y la cantidad de fármaco absorbido.

Además, dichos resultado concuerdan con los obtenidos en estudios previos, en los que se evaluaba el rendimiento de la formulación del par iónico para mejorar la permeabilidad del atenolol en el colon³². En ellos se observa como

la permeabilidad del atenolol formulado como par iónico, era superior en comparación con la permeabilidad que presentaba el atenolol en forma libre.

Por otra parte, al cotejar los resultados de Cmax y Tmax del grupo de las nanopartículas con los de los otros 2 grupos, se observa unos valores de Tmax y Cmax superiores. Al emplear una estrategia que combina un sistema de liberación controlada (NPs) con una técnica para potenciar la permeabilidad del fármaco (par iónico); lo que se espera obtener es una prolongación del tiempo de liberación del fármaco y un aumento de la absorción del mismo, lo cual se traduce en un aumento de los parámetros de Tmax y de Cmax.

Al analizar los resultados obtenidos de AUC de atenolol en los grupos analizados (Tabla 4), se observa como la biodisponibilidad de atenolol en la formulación de las NPs, es muy superior respecto a la de los otros 2 grupos.

Si tenemos en cuenta que la biodisponibilidad oral en humanos para el atenolol es de un 40-50%³²; los resultados reflejados en la Tabla 4, indican que las NPs desarrolladas, muestran una biodisponibilidad 4 veces mayor a la presentada por la solución de atenolol, administrada por vía oral en las mismas condiciones de trabajo.

Por lo tanto, los resultados del ensayo *in vivo* (Tabla 4 y Fig.6.), obtenidos con el grupo de las NPs, justifican la utilidad e idoneidad de la estrategia planteada en este estudio para controlar la liberación y mejorar la absorción del atenolol; alcanzándose unos niveles de biodisponibilidad cercanos al 100%.

Por otro lado, en la rata el tiempo total de tránsito gastrointestinal es de 15 h aproximadamente ³⁵; pasado ese tiempo, las nanopartículas deberían haber sido eliminadas del cuerpo del animal. Sin embargo, en la gráfica de concentración-tiempo, en el perfil de las NPs (Fig.6.), se observa la presencia de atenolol en el organismo 30 h después de la administración oral, esto

significa un aumento del 200% en lo que se refiere al tiempo total de permanencia en tránsito gastrointestinal.

Dicha prolongación del tiempo de residencia, también se describe en otros estudios (Isabel Lozoya et al¹²), en los que se evaluaban a el rendimiento de nanopartículas poliméricas de PLGA como sistema de liberación controlada de fármacos por vía oral. Este hecho podría indicar que las NPs elaboradas con PLGA como polímero poseen ciertas propiedades de mucoadhesividad en el tracto gastrointestinal.

Por lo tanto, su utilización podría resultar apropiada para lograr una liberación controlada de fármacos de permeabilidad moderada o incluso escasa como el atenolol, ya que un aumento del tiempo de residencia permitiría mejorar o incluso conseguir la absorción completa.



Conclusión

1. Se han obtenido unas nanopartículas poliméricas de PLGA que contenían un par iónico formado por atenolol + azul brillante. Dichas NPs, muestran un tamaño adecuado, con un EE% aceptable del par iónico. Además presentan una superficie lisa y sin imperfecciones.

2. Los ensayos de liberación *in vitro*, indican que la liberación de atenolol a partir de las nanopartículas es dependiente del pH con una liberación mayoritaria a $\text{pH} > 6.8$, lo que las hace idóneas para utilizarse como sistema de liberación controlada.

3. La baja permeabilidad del atenolol libre a nivel intestinal, se ha resuelto al formularlo como un par iónico, ya que su unión con el azul brillante, le permite actuar como una entidad neutra; facilitando así su paso por las membranas biológicas del tracto gastrointestinal. De esta forma el fármaco no tendrá problemas en el proceso de absorción cuando sea liberado desde las NPs en el intestino. Por otro lado, el perfil de concentración plasmática-tiempo de las nanopartículas muestra una liberación controlada a la vez que un incremento del tiempo de tránsito intestinal. Todo ello, ha permitido obtener una biodisponibilidad para el atenolol que se aproxima al 100%.

Por lo tanto, se puede afirmar que la estrategia de combinar un sistema de liberación modificada (NPs) con una técnica para potenciar la permeabilidad del fármaco (par iónico), es útil para obtener una pauta posológica y una biodisponibilidad óptimas por vía oral para fármacos de baja permeabilidad como el atenolol.

Bibliografía



1. J. Flórez. Farmacología: Concepto y objetivos. En: J. Flórez, J.A. Armijo, Á. Mediavilla. Farmacología Humana. 6ª Edición. Barcelona, España. Editorial Elsevier España. S.L. 2013. p. 1-2
2. K.Lullman. H.Hein. L. Mohr. Farmacología general, En: Farmacología: Texto y Atlas. 6ª Edición. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana. 2010. p. 1-9
3. José Doménech, Elvira Escribano. Preparados orales de cesión modificada: cinética. En: José Doménech, José Martínez, José María Pla. Biofarmacia y farmacocinética Volumen 2: Biofarmacia. 1ª edición. Madrid, España. Editorial Sintesis S.A. 1998. p. 318-320
4. José Doménech, Elvira Escribano. Preparados orales de cesión modificada: cinética. En: José Doménech, José Martínez, José María Pla. Biofarmacia y farmacocinética Volumen 2: Biofarmacia. 1ª edición. Madrid, España. Editorial Sintesis S.A. 1998. p. 323-327
5. Víctor Jiménez, José Mª. Plá, Adela Martín. Factores Fisiológicos en la absorción gastrointestinal (I) En: José Doménech, José Martínez, José María Pla. Biofarmacia y farmacocinética Volumen 2: Biofarmacia. 1ª edición. Madrid, España. Editorial Sintesis S.A. 1998. p. 146-161.
6. José Mª. Plá, Adela Martín. Absorción gastrointestinal En: José Doménech, José Martínez, José María Pla. Biofarmacia y farmacocinética Volumen 2: Biofarmacia. 1ª edición. Madrid, España. Editorial Sintesis S.A. 1998. p. 135-143.
7. Ana Polache, Luis Granero. Absorción: Estudio General. En: José Doménech, José Martínez, José María Pla. Biofarmacia y farmacocinética Volumen 2: Biofarmacia. 1ª edición. Madrid, España. Editorial Sintesis S.A. 1998. p. 82-93.
8. Lennernas H. Regional intestinal drug permeation: biopharmaceutics and drug development. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2014, 57, 333-41.

9. Langer R. Invited review polymeric delivery systems for controlled drug release. *Chem. Eng. Commun.* 1980. 6. p. 1-48.
10. Fassihi, R.A. Ritschel, W.A. Multiple-layer, direct-compression, controlled-release system: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J Pharm Sci.* 1993 Jul; 82 (7):750-4.
11. Chourasia, M. K.; Jain, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 2003, 6, (1), 33-66
12. Isabel Lozoya-Agullo, Francisca Araújo, Isabel González-Álvarez, Matilde Merino-Sanjuán, Marta González-Álvarez, Marival Bermejo et al. PLGA nanoparticles are effective to control the colonic release and absorption on ibuprofen. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Mar 30; 115:119-125
13. Langer R. News methods of drug delivery. *Science.* 1990 Sep. 29 ;249 (4976):1527-33
14. S. Gad. *Pharmaceutical manufacturing handbook production and process.* 1º Edición. New Jersey; USA. Editorial Wiley. 2008. P 1231-54
15. R. Infante, A. Cebrián, A. Vara. Los polímeros en medicina [Sede web]. [2015; 24-02-2018]. Disponible en: http://www.eis.uva.es/macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables.htm.
16. Gomes, M. J.; Fernandes, C.; Martins, S.; Borges, F.; Sarmiento, B. Tailoring Lipid and Polymeric Nanoparticles as siRNA Carriers towards the Blood-Brain Barrier - from Targeting to Safe Administration. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 2016.

17. Kreuter, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews* 2001, 47, (1), 65-81.
18. Fishbein, I.; Chorny, M.; Rabinovich, L.; Banai, S.; Gati, I.; Golomb, G. Nanoparticulate delivery system of a tyrophostin for the treatment of restenosis. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2000, 65, (1-2), 221-9.
19. Nascimento, A. V.; Singh, A.; Bousbaa, H.; Ferreira, D.; Sarmiento, B.; Amiji, M. M. Overcoming cisplatin resistance in non-small cell lung cancer with Mad2 silencing siRNA delivered systemically using EGFR-targeted chitosan nanoparticles. *Acta biomaterialia* 2016.
20. Sham, J. O.; Zhang, Y.; Finlay, W. H.; Roa, W. H.; Lobenberg, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *Int J Pharm* 2004, 269, (2), 457-67.
21. Cunha-Reis, C.; Machado, A.; Barreiros, L.; Araujo, F.; Nunes, R.; Seabra, V.; Ferreira, D.; Segundo, M. A.; Sarmiento, B.; das Neves, J. Nanoparticles-in-film for the combined vaginal delivery of anti-HIV microbicide drugs. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2016, 243, 43-53.
22. A. Sánchez- García. J. Saíz. Farmacología de la hipertensión arterial, la insuficiencia vascular periférica y angiogénesis. En: J. Flórez, J.A. Armijo, Á. Mediavilla. Farmacología Humana. 6ª Edición. Barcelona, España. Editorial Elsevier España. S.L. 2013 p. 633-651.
23. Etmayer, P., Amidon, G.L., Clement, B., Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 2393–2404.
24. Shrestha, N., Shahbazi, M.A., Araujo, F., Zhang, H., Makila, E.M., Kauppila, J., Sarmiento, B., Salonen, J.J., Hirvonen, J.T., Santos, H.A. Chitosan-modified

porous silicon microparticles for enhanced permeability of insulin across intestinal cell monolayers. *Biomaterials*. 2014. 35, 7172–7179.

25. Miller, J.M., Dahan, A., Gupta, D., Varghese, S., Amidon, G.L. Quasi-equilibrium analysis of the ion-pair mediated membrane transport of low-permeability drugs. *J. Control. Release: Off. J. Control. Release Soc.* 2009. 137, 31–37.

26. Suresh P.K. Ion-paired drug delivery: an avenue for bioavailability improvement. *Sierra Leone J. Biomed. Res.* 2011. 3, 70–76.

27. Lozoya-Agullo, I., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Merino-Sanjuan, M., Bermejo, M. In situ perfusion model in rat colon for drug absorption studies: comparison with small intestine and Caco-2 cell model. *J. Pharm. Sci.* 2015. 104, 3136–3145.

28. Bonelli P. Tuccillo FM. Federico A. Napolitano M. Borrelli A. Melisi D. et al. Ibuprofen delivered by poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles to human gastric cancer cells exerts antiproliferative activity at very low concentrations. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:5683-91

29. Rouge, N.; Buri, P.; Doelker, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. *Int J Pharm* 1996, 136, (1-2), 117-139.

30. Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Le Breton A., Preat V. ; PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release J Control Release*. 2012 Jul 20; 161(2):505-22

31. Tannergren C., Bergendal A., Lennernas H., Abrahamsson B.; Toward an increased understanding of the barriers to colonic drug absorption in humans: implications for early controlled release candidate assessment. *Mol. Pharm.* 2009. 6, 60–73.

32. Lozoya-Agullo I, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Merino-Sanjuán M, Bermejo M. Development of an ion-pair to improve the colon permeability of a low permeability drug: Atenolol. *Eur J Pharm Sci.* 2016 Oct 10; 93: 334-40.
33. Ahmad MZ, Akhter S, Ahmad I, Singh A, Anwar M, Shamim M, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of Assam Bora rice starch-based bioadhesive microsphere as a drug carrier for colon targeting. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012 Feb; 9(2):141-9.
34. Situ W, Li X, Liu J, Chen L. Preparation and characterization of glycoprotein-resistant starch complex as a coating material for oral bioadhesive microparticles for colon-targeted polypeptide delivery. *J. Agric. Food Chem.* 2015. 63, 4138–4147.
35. Sjögren E, Abrahamsson B, Augustijns P, Becker D, Bolger MB, Brewster M, et al. *In vivo* methods for drug absorption - comparative physiologies, model selection, correlations with *in vitro* methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Jun 16; 57:99-151.